



سیتیک زمان - کشندگی نانولیپوزوم‌های حاوی نانوذرات اکسیدروی علیه /شرشیاکلی و /استافیلوکوکوس اورئوس

پروین سوری^۱، آریو امامی‌فر^{۲*}، نفیسه دعوتی^۳

- ۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد فناوری مواد غذایی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان
- ۲- دانشیار گروه صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان
- ۳- استادیار گروه صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه بوعلی سینا، همدان

چکیده

اطلاعات مقاله

تاریخ‌های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۴/۱۳

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۵/۲۱

کلمات کلیدی:

سیتیک زمان - کشندگی،

نانولیپوزوم،

نانواکسیدروی.

هدف این مطالعه بررسی اثر ضد میکروبی نانولیپوزوم‌های حاوی نانوذرات اکسیدروی در نسبت‌های مختلف لسیترین به نانو ذرات اکسیدروی (۵:۱، ۱۵:۱ و ۲۵:۱ وزنی- وزنی) بر علیه سویه‌های /شرشیاکلی (ATCC 2592) و /استافیلوکوکوس اورئوس (ATCC 25923) در محیط کشت آزمایشگاهی بود. نانولیپوزوم‌های حاوی نانوذرات اکسیدروی به دو روش آب پوشانی لایه نازک و حرارتی تهیه شدند. مقادیر حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) نانولیپوزوم‌های حاوی نانوذرات اکسید روی تولید شده در مقایسه با نانوذرات اکسید روی بدون پوشش بر علیه سویه‌های /شرشیاکلی و /استافیلوکوکوس اورئوس تعیین و فعالیت ضد میکروبی آن‌ها با استفاده از منحنی زمان- کشندگی ارزیابی گردید. نتایج نشان داد که درون پوشانی نانو ذرات اکسید روی با استفاده از سامانه های نانولیپوزومی با افزایش میزان نفوذ به داخل سلول میکروارگانیسم به صورت معنی داری سبب افزایش قدرت ضد میکروبی آن‌ها گردید ($p < 0.05$). نانولیپوزوم حاوی نانوذرات اکسیدروی تولید شده به روش آب پوشانی لایه نازک در مقایسه با روش حرارتی قدرت ضد میکروبی بالاتری داشتند. بر طبق منحنی های زمان- کشندگی، طول فاز لگاریتمی باکتری‌های /شرشیاکلی (۸ ساعت) و /استافیلوکوکوس اورئوس (۷ ساعت) در محیط کشت شامل نانولیپوزوم‌های حاوی نانو ذرات اکسیدروی تولید شده به روش آب پوشانی لایه نازک با بالاترین نسبت لسیترین به نانوذرات اکسید (۲۵:۱ وزنی- وزنی) به ترتیب در مقادیر حداقل غلظت بازدارندگی به ۵ و ۴ ساعت و حداقل غلظت کشندگی به ۲ و کمتر از یک ساعت کاهش یافت.

DOI: 10.22034/FSCT.20.141.36
DOR:20.1001.1.20088787.1402.20.141.3.1

* مسئول مکاتبات:

a.emamifar@basu.ac.ir

۱- مقدمه

فناوری نانو به روش طراحی، تولید و کاربرد ساختارها، ابزار و سیستم‌ها در مقیاس نانو اطلاق می‌گردد [۱]. از جمله کاربردهای مهم این فناوری در صنایع غذایی تولید مواد با عملکردهای جدید، تسهیل روند تحویل محصول به دست مشتری و تولید فرمولاسیون و بسته بندی های نوین مواد غذایی و توسعه فرآیندهای انتقال مواد در ابعاد نانومتری است [۲]. نانوحامل‌ها، سیستم‌هایی برای انتقال ترکیبات مغذی، دارویی یا مولکول‌های زیستی با به دام انداختن آن‌ها را در حفره‌های درونی و یا با جذب در سطح خارجی خود هستند [۳]. درون پوشانی، فرایندی برای به دام انداختن ترکیبات فعال در کپسول‌های کوچک با رها سازی محتویاتش در سرعت و زمان های کنترل شده است. این فناوری در زمینه‌های گوناگون داروسازی، ساخت لوازم‌آرایی و بهداشتی و صنایع غذایی غذا کاربرد دارد [۴]. نانو حامل‌های مورد استفاده در صنایع غذایی در دو دسته بیوپلیمری و لیپیدی قرار می‌گیرند. نانوحامل‌های لیپیدی شامل نانو امولسیون‌ها، نانولیپوزوم‌ها و نانوذرات لیپیدی جامد می‌باشند. لیپوزوم‌ها به دلیل ساختار قطبی تشکیل شده از غشای دو لایه فسفولیپیدی، توانایی حمل و جذب ترکیبات آبدوست و آبگریز را در محیط روغنی و آبی دارند [۵]. از جمله مزایای لیپوزوم‌ها می‌توان به امکان تولید در مقیاس صنعتی، سازگاری با محیط زیست، زیست تخریب پذیری و عدم حضور ترکیبات سمی در ساختار آن‌ها اشاره کرد [۶]. اندازه وزیکول، تعداد لایه‌ها و روش تولید، اساس طبقه‌بندی لیپوزوم‌ها است [۷ و ۸]. لیپوزوم‌هایی که فقط حاوی یک غشا دو لایه‌ای هستند وزیکول‌های تک لایه‌ای نامیده می‌شوند. وزیکول‌های تک لایه نیز به دو نوع وزیکول تک لایه‌ای کوچک با اندازه کمتر از ۱۰۰ نانومتر و وزیکول‌های تک لایه‌ای بزرگ با اندازه بزرگتر از ۱۰۰ نانومتر تقسیم‌بندی می‌شوند [۹].

وزیکول‌های چند لایه، لیپوزوم‌هایی متشکل از تعدادی وزیکول دو لایه‌ای هم‌مرکز هستند. وزیکول‌های تشکیل شده از چندین وزیکول غیر هم‌مرکز که توسط یک غشای دو لایه‌ای احاطه شده‌اند، وزیکول چند وزیکولی نامیده می‌شوند [۱۰]. از جمله روش‌های تولید لیپوزوم‌ها می‌توان به روش‌های مکانیکی نظیر آب پوشانی لایه نازک و سونیکاسیون، هموژنیزاسیون و ریزسیال سازی و غیرمکانیکی نظیر تبخیر فاز معکوس، خشک کن انجمادی و روش حرارتی اشاره کرد [۷]. مواد نانوساختار با ویژگی‌های ضد میکروبی به دو گروه نانو مواد ضد میکروبی غیر آلی (نقره، دی اکسید تیتانیوم، اکسید روی، مس، رس‌ها و نانولوله های کربنی) و مواد ضد میکروبی آلی تقسیم می‌شوند [۱۱]. در این میان نانوذرات اکسیدروی که در گروه ترکیبات ایمن برای مصرف کننده نیز قرار دارد، با دارا بودن مزایای فراوانی نظیر فرآیند آسان تولید، ارزان بودن، هدایت گرمایی بالا، فعالیت ضد میکروبی مناسب، مورد توجه بسیاری از صنایع از جمله صنایع غذایی قرار گرفته‌اند. عملکرد ضد میکروبی نانوذرات اکسیدروی بر بسیاری از باکتری‌های گرم مثبت، گرم منفی و قارچ‌ها به اثبات رسیده است [۱۳ و ۱۲]. ترکیب و افزودن نانوذرات اکسیدروی به فرمولاسیون‌های غذایی به دلیل عدم توزیع یکنواخت در اجزای تشکیل دهنده فرمول، بسیار چالش برانگیز است. لذا درون پوشانی نانوذرات اکسیدروی در ساختارهای نانولیپوزومی با هدف توزیع مناسب و پایدار نانواکسیدروی در فرمولاسیون‌های غذایی از جمله راه‌کارهای مرتفع سازی چالش فوق می‌باشد [۱۴]. تولید نانولیپوزوم به روش آب پوشانی لایه نازک به دلیل سهولت عمل و ارزان قیمت‌تر بودن و روش حرارتی یا مظفیری به دلیل عدم استفاده از حلال آلی و قابلیت صنعتی شدن در صنعت مورد توجه زیادی قرار گرفته است [۱۵]. با توجه به موارد اشاره شده لزوم یافتن روشی مناسب و برای توزیع یکنواخت و با حداقل مقدار نانومواد اکسیدروی در

فرمولاسیون‌های غذایی با هدف غنی‌سازی و یا استفاده از ویژگی ضد میکروبی این ترکیب ضروری به نظر می‌رسد.

۲-مواد و روش‌ها

۲-۱-مواد

نانوذرات اکسیدروی با خلوص ۹۹/۹ درصد (شرکت مینا تجهیز، تهران)، لستین‌سویا (ال-آلفا- فسفاتیدیل‌کولین) (سیگما، آلمان)، اتانول ۹۹/۹ درصد، بافر فسفات، توین ۸۰، محیط کشت مولر هینتون براث و مولر هینتون آگار از شرکت مرک آلمان تهیه شدند. سوش‌های میکروبی/اشرشیا کلی (ATCC 2592) و استافیلوکوکوس/اورئوس (ATCC 25923) از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران (IROST) تهیه شدند.

۲-۲-تولید نانولیپوزوم به روش حرارتی

نانولیپوزوم‌ها طبق روش راستی و همکاران (۲۰۱۲) با کمی تغییر و بدون استفاده از حلال آلی تولید شدند [۱۶]. فاز آبی شامل محلول لستین ۳ درصد (وزنی - حجمی) در بافر فسفات ($\text{pH} = 7.4 - 7.2$) در حمام آبگرم با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه تهیه گردید. مقادیر مشخص نانوذرات اکسیدروی با هدف دستیابی به سطوح مختلف لستین به نانوذرات اکسیدروی (در سه سطح ۵:۱، ۱۵:۱ و ۲۵:۱ وزنی - وزنی) به فاز آبی اضافه گردید و در حمام آبگرم با دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۶۰ دقیقه روی همزن مغناطیسی با سرعت ۶۰۰ دور در دقیقه مخلوط شد. به منظور دستیابی به توزیع یکنواخت نانو لیپوزوم‌ها، امولسیون‌ها با هموژنایزر (Dragon-Lab, D-500, China) با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه به هم زده شدند.

۲-۳-تولید نانو لیپوزوم به روش آب پوشانی لایه نازک

نانولیپوزوم‌ها مطابق با روش چاو و همکاران (۲۰۲۰) با کمی تغییر تولید شدند [۱۷]. ابتدا محلول لستین ۳ درصد (وزنی - حجمی) در اتانول خالص و سپس مقادیر مشخص نانوذرات اکسیدروی با هدف دستیابی به نسبت‌های لستین به نانوذرات اکسیدروی (در سه سطح ۵:۱، ۱۵:۱ و ۲۵:۱ وزنی - وزنی) به ترکیب فوق افزوده شد. این ترکیب به آرامی به محلول بافر فسفات ($\text{pH} = 7.4 - 7.2$) حاوی توین ۸۰ افزوده شد و به مدت ۲ ساعت در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به هم زده شد. محلول حاصل به اوپراتور چرخشی تحت خلا (LabTech EV311H, China) جهت تبخیر اتانول در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد منتقل گردید. لایه نازک تشکیل شده با ۱۰ میلی‌لیتر آب دیونیزه استریل شستشو با هموژنایزر (Dragon-Lab, D-500, China) با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵ دقیقه به هم زده شدند. در انتها مخلوط لیپوزومی در حمام یخ با استفاده از پروپ سونیکاتور (Ultrasonic Homogenizer UH-600) با قدرت ۵ سیکل یک دقیقه‌ای با یک دقیقه استراحت مخلوط گردید.

۲-۴-فعال‌سازی اولیه سویه‌های میکروبی

سویه‌های میکروبی بر محیط کشت مولر هینتون آگار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد طی ۲۴ ساعت به صورت خطی کشت داده شدند. جهت اطمینان از نوع سویه، تک کلنی انتخاب و پس از رنگ‌آمیزی گرم، بررسی‌های میکروسکوپی انجام شد. سویه‌ها تا زمان استفاده در محیط کشت مولر هینتون براث حاوی ۱۵٪ گلیسرول و در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند [۱۲].

۲-۵- تعیین مقادیر حداقل غلظت بازدارندگی از رشد ((Minimum inhibitory concentration (MIC) و حداقل غلظت کشندگی ((Minimum Bactericidal Concentration (MBC)

به منظور تعیین حداقل غلظت مهار کنندگی رشد (MIC) نانوذرات اکسید روی و نانولیپوزوم‌های حاوی نانوذرات اکسیدروی بر رشد باکتری‌های مورد مطالعه از روش رقیق سازی با استفاده از میکروپلیت های ۹۶ خانه استفاده شد. به اولین چاهک هر ردیف ۱۰۰ میکرولیتر از محلول‌های استوک نانواکسیدروی با غلظت‌های ۸۰، ۱۰۰، ۱۲۰ و ۱۴۰ میلی گرم بر میلی لیتر به صورت جداگانه اضافه شد. غلظت ترکیبات نانوساختار در محدود ۰/۷۸ تا ۵۰ میلی گرم بر میلی لیتر تنظیم شد. ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون کشت تازه میکروبی در محیط کشت مولر هیتون برات از هر سویه با غلظت نیم مک فارلند (cfu/mL) $10^8 \times 1/5$ به تمامی چاهک‌های مورد مطالعه افزوده شد. آخرین چاهک از هر ردیف حاوی محیط کشت و باکتری (محیط فاقد نانو ذرات) به عنوان کنترل مثبت و یک ردیف از میکروپلیت حاوی محیط کشت و غلظت‌های مختلف نانو ذرات (محیط فاقد باکتری) به عنوان کنترل منفی در نظر گرفته شد. میکروپلیت‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند. کمترین غلظت از سوسپانسیون نانو مواد در چاهک که کدورت نشان نداد به عنوان حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) نانو ذرات تعیین شد. مقدار ۱۰۰ میکرولیتر از هریک از چاهک‌هایی که در آن‌ها باکتری رشد نکرده و کدورتی مشاهده نشد به محیط مولر هیتون آگار منتقل و به صورت سطحی کشت شد. پس از ۲۴ ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، پلیت‌ها از نظر رشد باکتری‌ها بررسی شدند. غلظتی از نانومواد که باکتری رشد نکرده بود، به عنوان حداقل غلظت باکتری‌کشی (MBC) در نظر گرفته شد [۱۸].

۲-۶- ارزیابی منحنی زمان - کشندگی (Time-kill curve analysis)

به ۴۹ میلی لیتر محیط کشت مولر هیتون برات ۵۰۰ میکرولیتر سوسپانسیونی از هر سویه میکروبی که در مرحله انتهای فاز لگاریتمی قرار داشت با غلظت تقریبی (cfu/mL) $10^6 - 10^5$ اضافه شد. ۵۰۰ میکرولیتر از هر یک از غلظت‌های (MIC و MBC) نانولیپوزوم های تهیه شده و نانواکسیدروی بدون پوشش به صورت جداگانه به محیط مورد نظر افزوده شده و در گرمخانه با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار گرفت. جهت ارزیابی منحنی رشد باکتری ها بدون حضور نانوذرات و در حضور هر یک از نانوذرات و در فواصل زمانی مشخص (یک ساعت) و در طی ۸ ساعت نمونه برداری از محیط صورت گرفته، بر محیط کشت مولر هیتون آگار کشت داده و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت نگهداری شدند. تعداد کلنی ها به صورت (Log cfu/mL) گزارش و منحنی رشد باکتری ها برحسب تغییرات تعداد باکتری ها (Log cfu/mL) در واحد زمان ترسیم گردید [۱۹].

۲-۷- آنالیز آماری

این ارزیابی بر اساس روش فاکتوریل و طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار انجام شد. تحلیل داده‌ها با آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) با نرم افزار (SPSS) انجام شد. میانگین‌ها بر اساس حداقل تفاوت معنی‌دار (LSD) در سطح احتمال ۵ درصد مقایسه شدند.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- بررسی میزان حداقل غلظت بازدارندگی از رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC)

مقایسه میانگین‌های حداقل بازدارندگی از رشد و حداقل غلظت کشندگی نانوذرات اکسید روی آزاد و نانولیپوزوم-های تهیه شده به روش حرارتی (Thin) و آب پوشانی لایه نازک (Therm) علیه باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *شرشیا کلی* در جدول ۱ آورده شده است. نتایج نشان دهنده افزایش معنی دار ($p < 0.05$) قدرت ضد میکروبی نانوذرات اکسیدروی درون پوشانی شده در سامانه‌های نانولیپوزومی در مقایسه با نانوذرات اکسیدروی بدون پوشش بود. این افزایش را می‌توان به افزایش انعطاف-پذیری و قدرت مانور نانوذرات اکسیدروی درون پوشانی شده در حامل‌های نانولیپوزومی در مقایسه با نمونه‌های آزاد مرتبط دانست [۲۰]. قدرت ضد میکروبی نانوذرات اکسیدروی به ایجاد تنش اکسیداتیو حاصل از تولید رادیکال‌های اکسیژن آزاد (ROS) در غشاء سلولی، آزاد سازی کاتیون روی در محیط رشد میکروارگانیسم‌ها و یا تماس مستقیم نانوذرات اکسید روی با دیواره سلولی

میکروارگانیسم‌ها مرتبط است [۱۳]. تفاوت در ساختار دیواره سلولی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی در میزان اتصال نانو ذرات اکسیدروی به سطح دیواره سلولی تأثیرگذار است. علی‌رغم وجود لایه پپتیدوگلیکان ضخیم‌تر در دیواره باکتری‌های گرم مثبت که مانع از نفوذ نانوذرات به درون سلول است، پروتئین‌های سطحی پپتیدوگلیکان و همچنین لیپوتیکوئیک اسیدها به عنوان جایگاه‌های اتصال نانو ذرات اکسیدروی در دیواره سلول عمل نموده و لذا حساسیت باکتری‌های گرم مثبت را در مقایسه با باکتری‌های گرم منفی نسبت به نانوذرات اکسیدروی افزایش می‌دهند. وجود غشاء خارجی لیپوپلی‌ساکاریدی در اطراف دیواره سلولی باکتری‌های گرم منفی عامل محافظتی خوبی در برابر نفوذ نانوذرات است [۲۱]. لی و همکاران (۲۰۰۹) در بررسی اثر ضد میکروبی نانو ذرات اکسید روی پوشش داده شده بر فیلم پلی وینیل کلراید علیه باکتری‌های *استافیلوکوکوس اورئوس* و *شرشیا کلی* نشان دادند که قدرت ضد میکروبی این نانوذرات علیه باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از گرم منفی است که با نتایج این پژوهش مطابقت داشت [۲۲].

Table 1. The minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum bacteriocidal concentration (MBC) values of free nano-ZnO and nano-ZnO loaded nanoliposomes prepared by thin layer hydration sonication (Thin) and heat method (Therm) with the different ratio of lecithin: nano-ZnO (5:1, 15:1 and 25:1 w/w), against *Escherichia coli* (ATCC 2592) and *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Different letters indicate statistically significant differences at ($p < 0.05$).

Antimicrobial agents	Microorganisms type			
	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 2592)		<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	
	MIC value	MBC value	MIC value	MBC value
Free nano-ZnO	15.27 ^a ± 0.07	20.00 ^a ± 0.07	7.59 ^a ± 0.07	15.15 ^a ± 0.07
Therm 5:1	6.66 ^b ± 0.07	13.34 ^b ± 0.07	6.66 ^b ± 0.07	6.65 ^b ± 0.14
Therm 15:1	5.33 ^c ± 0.14	10.65 ^c ± 0.14	2.65 ^c ± 0.14	5.32 ^c ± 0.08
Therm 25:1	2.65 ^d ± 0.08	5.31 ^d ± 0.08	1.32 ^d ± 0.08	2.65 ^d ± 0.02
Thin 5:1	6.66 ^b ± 0.07	13.34 ^b ± 0.07	6.66 ^b ± 0.07	6.65 ^b ± 0.03
Thin 15:1	5.33 ^c ± 0.14	10.65 ^c ± 0.14	2.65 ^c ± 0.14	5.32 ^c ± 0.15
Thin 25:1	2.65 ^d ± 0.08	5.31 ^d ± 0.08	1.32 ^d ± 0.08	1.32 ^e ± 0.10

۳-۲- بررسی منحنی زمان - کشندگی /شرشیاکلی

مطابق شکل ۱ طول ۸ ساعت فاز لگاریتمی باکتری /شرشیاکلی در حضور نانوذرات اکسیدروی بدون پوشش در غلظت حداقل بازدارندگی به ۵ و در غلظت حداقل کشندگی به ۳ ساعت کاهش یافت. طول فاز لگاریتمی باکتری /شرشیاکلی در حضور نانوذرات اکسیدروی درون پوشانی شده به روش حرارتی در سطوح مختلف لسیتین به نانوذرات (۵:۱، ۱۵:۱ و ۲۵:۱ وزنی -وزنی) به ترتیب در غلظت حداقل بازدارندگی به ۵، ۵ و ۵ ساعت و در غلظت حداقل کشندگی به ۳، ۲ و ۲ ساعت کاهش یافت. همچنین در حضور نانولیپوزوم‌های حاوی نانوذرات اکسیدروی تهیه شده به روش آب پوشانی لایه نازک در سطوح مختلف لسیتین به نانوذرات (۵:۱، ۱۵:۱ و ۲۵:۱ وزنی -وزنی) به ترتیب در غلظت حداقل بازدارندگی ۵، ۴ و ۴ ساعت و در غلظت حداقل کشندگی به ۳، ۲ و ۲ ساعت کاهش یافت. افزایش نسبت لسیتین به نانوذرات اکسید روی سبب کاهش مقادیر حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) نانولیپوزوم‌های حاوی نانوذرات اکسید- روی علیه رشد باکتری های /شرشیاکلی طی ۸ ساعت گردید. طول فاز لگاریتمی باکتری های /شرشیاکلی در مقادیر برابر (MIC و MBC) نانولیپوزوم‌های حاوی نانوذرات اکسید روی تولید شده به روش حرارتی و آب پوشانی لایه نازک در نسبت های کم لسیتین به نانوذرات اکسیدروی (۵:۱) یکسان بود. افزایش نسبت لسیتین به نانوذرات اکسیدروی در مقادیر برابر (MBC) نانولیپوزوم- های حاوی نانوذرات اکسیدروی تولید شده به روش حرارتی و آب پوشانی لایه نازک، طول فاز لگاریتمی باکتری /شرشیا کلی را کاهش داد. افزایش نسبت لسیتین به نانوذرات اکسیدروی در مقادیر برابر (MIC) نانولیپوزوم‌های تولید شده به روش حرارتی تغییری در طول فاز لگاریتمی باکتری /شرشیاکلی ایجاد نکرد. مطابق شکل ۱، تغییر تعداد

(Log cfu/ml) باکتری‌های /شرشیاکلی نسبت به تعداد اولیه طی ۸ ساعت رشد، معادل ۲/۴۴ بود. میزان این تغییرات در مقادیر برابر (MIC و MBC) نانوذرات اکسید روی بدون پوشش (۰/۶۴ + و ۱/۱۹ -) و نانولیپوزوم‌های حاوی نانواکسیدروی با نسبت لسیتین به نانوذرات اکسید روی (وزنی-وزنی) در سطوح مختلف (۵:۱)، (۱۵:۱) و (۲۵:۱) در روش حرارتی به ترتیب (۰/۳۴ و ۱/۳۶ -)، (۰/۴ و ۱/۶۶ -) و (۰/۲۴ - و ۲/۶۶ -) و در روش آب پوشانی به ترتیب (۰/۳۴ و ۱/۶۶ -)، (۰/۴ و ۲/۱۶ -) و (۰/۳۱ - و ۲/۶۶ -) اندازه گیری شد. بررسی منحنی های شکل ۱ نشان داد که نانولیپوزوم‌های تولیدی با استفاده از روش آب پوشانی لایه نازک در مقایسه با روش حرارتی، قدرت ضد میکروبی بیشتری علیه /شرشیاکلی در غلظت های یکسان لسیتین داشتند. لگاریتم تعداد باکتری /شرشیاکلی در حضور نانولیپوزوم‌های حاوی نانواکسید روی با نسبت (۲۵:۱) لسیتین به نانواکسیدروی (وزنی- وزنی)، در روش آب پوشانی لایه نازک پس از ۷ ساعت و در حضور همان نانولیپوزوم‌های تولید شده در روش حرارتی پس از ۸ ساعت به صفر رسید.

ور و همکاران (۲۰۰۴) با بررسی قدرت ضد میکروبی نایسین درون پوشانی شده در لیپوزوم‌های فسفولیپیدی علیه لیستریا مونوسایترژنز نشان دادند که درون پوشانی نایسین در لیپوزوم‌ها سبب کاهش ۲ سیکل لگاریتمی تعداد باکتری- ها در مقایسه با نایسین آزاد گردید [۲۳]. جین و همکاران (۲۰۰۹) نیز نشان دادند که استفاده از نانوذرات اکسیدروی پوشش دار شده با پلی وینیل پیرولیدون در مقایسه با نانوذرات اکسیدروی بدون پوشش توانایی بیشتری در کاهش تعداد باکتری‌های /شرشیاکلی در محیط سفیده تخم مرغ مایع دارد که با نتایج این تحقیق مطابقت داشت [۲۴].

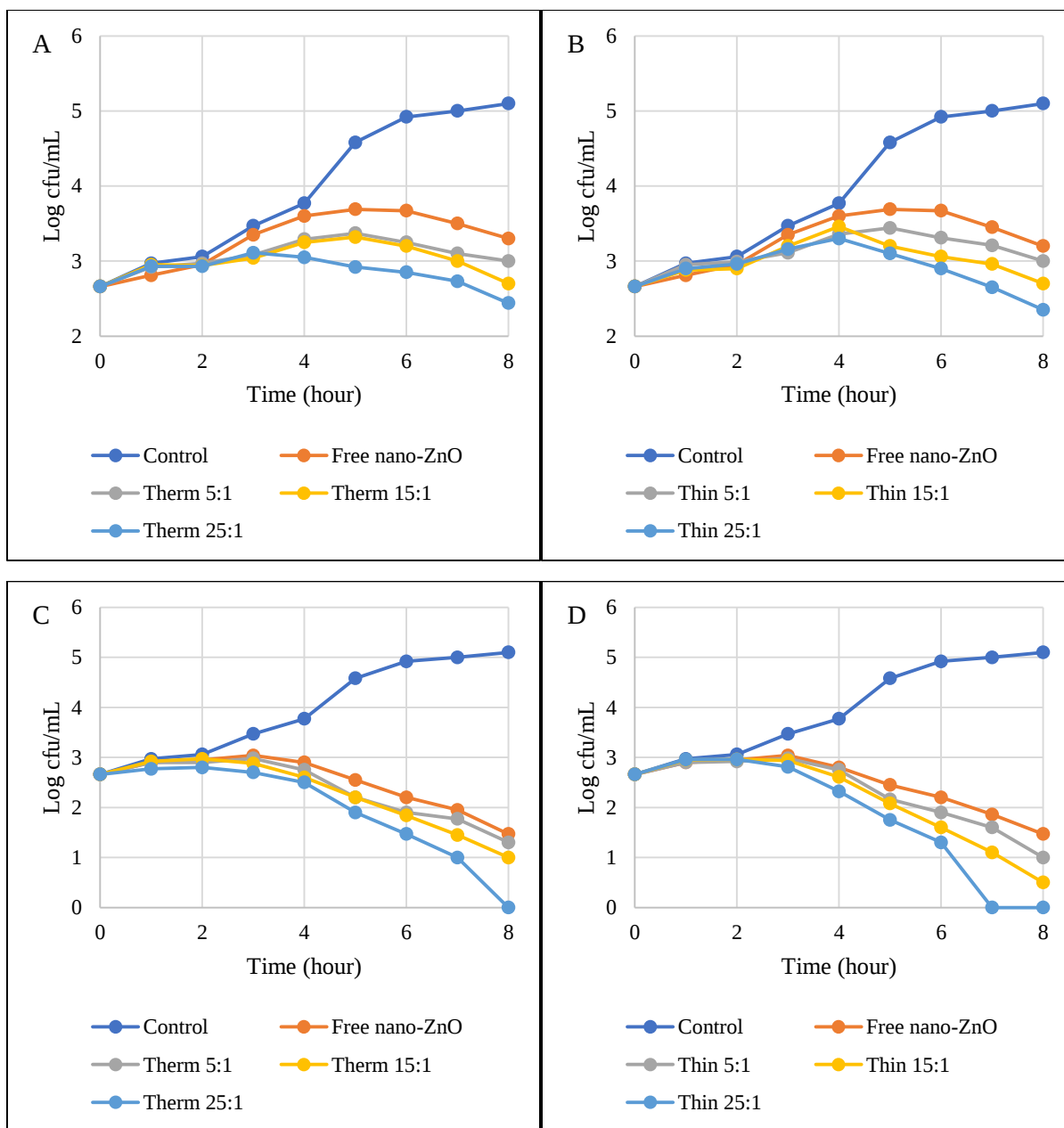


Fig. 1. Time-kill graph of free nano-ZnO and nano-ZnO loaded nanoliposomes prepared by thin layer hydration sonication (Thin) and heat method (Therm) with the different ratio of lecithin: nano-ZnO (5:1, 15:1 and 25:1 w/w) against *E. coli* (ATCC 2592) at MIC value of free nano-ZnO and nano-ZnO loaded nanoliposomes prepared by Therm (A) and Thin (B) and MBC value of free nano-ZnO and nano-ZnO loaded nanoliposomes prepared by Therm (C) and Thin (D). In all figures "Control" means growth without any antimicrobial agent.

۳-۳- بررسی منحنی زمان - کشندگی استافیلوکوکوس اورئوس

مطابق شکل ۲، طول فاز لگاریتمی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس حدود ۷ ساعت بود که در حضور نانوذرات اکسیدروی بدون پوشش در غلظت حداقل بازدارندگی (MIC) به ۵ و در غلظت حداقل کشندگی (MBC) به ۴ ساعت کاهش یافت. طول فاز لگاریتمی این باکتری هادر حضور نانوذرات اکسید روی درون پوشانی شده به روش حرارتی در سطوح مختلف لستین به نانوذرات اکسید روی (۵:۱، ۱۵:۱ و ۲۵:۱ وزنی - وزنی) به ترتیب در غلظت حداقل بازدارندگی به ۵، ۵ و ۴ ساعت و در غلظت حداقل کشندگی به کمتر از یک ساعت کاهش یافت. از سوی دیگر طول فاز لگاریتمی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در حضور نانولیپوزوم های حاوی نانوذرات اکسید روی تهیه شده به روش آب پوشانی لایه نازک در سطوح مختلف لستین به نانوذرات اکسید روی (۵:۱، ۱۵:۱ و ۲۵:۱ وزنی - وزنی) به ترتیب در غلظت حداقل بازدارندگی ۵، ۴ و ۴ ساعت و در غلظت حداقل کشندگی به کمتر از یک ساعت رسید. کاربرد نانولیپوزوم ها در تمامی نسبت های لستین به نانوذرات اکسیدروی در کاهش طول دوره لگاریتمی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس در مقادیر برابر (MIC و MBC) در هر دو روش حرارتی و آب پوشانی لایه نازک موثر بود و افزایش نسبت لستین به نانوذرات اکسیدروی طول فاز لگاریتمی باکتری استافیلوکوکوس اورئوس را کاهش داد. مطابق شکل ۲ تغییر تعداد (Log cfu/ml) باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس نسبت به تعداد اولیه طی ۸ ساعت رشد، معادل ۲/۷۶ بود. این تغییرات در مقادیر برابر (MIC و MBC) نانوذرات اکسید روی بدون پوشش (۲۱/۰+ و ۱/۵۴-) و نانولیپوزوم های حاوی نانواکسیدروی تهیه شده با نسبت لستین به نانوذرات اکسیدروی (وزنی-وزنی) در سطوح مختلف (۵:۱)، (۱۵:۱) و (۲۵:۱) در روش حرارتی

به ترتیب (۰/۰۴- و ۱/۸۴-)، (۰/۱۹- و ۲/۵۴-) و (۰/۳۹- و ۳/۰۴-) و در روش آب پوشانی به ترتیب (۰/۱۴- و ۲/۰۴-)، (۰/۴۰- و ۳/۰۴-) و (۰/۵۴- و ۳/۰۴-) اندازه گیری شد. نتایج شکل ۲ نشان داد که افزایش نسبت لستین به نانوذرات اکسید روی سبب کاهش مقادیر حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) نانولیپوزوم های حاوی نانوذرات اکسیدروی علیه باکتری- های استافیلوکوکوس اورئوس طی ۸ ساعت شد. بررسی منحنی های شکل ۲ نشان داد که نانولیپوزوم های تولیدی با استفاده از روش آب پوشانی لایه نازک در مقایسه با روش حرارتی، قدرت ضد میکروبی بیشتری علیه استافیلوکوکوس اورئوس در غلظت های یکسان لستین داشتند به طوری که در حضور نانولیپوزوم های تولیدی با نسبت (۲۵:۱) لستین به نانوذرات اکسید روی (وزنی - وزنی)، در روش آب پوشانی لایه نازک پس از ۷ ساعت و در حضور همان نانولیپوزوم های تولید شده در روش حرارتی پس از ۸ ساعت به صفر رسید. مطالعات الاغیل و همکاران (۲۰۱۶) نشان داد که قدرت ضد میکروبی نانوذرات اکسیدروی علیه استافیلوکوکوس اورئوس در مقایسه با نانواکسیدروی به شدت افزایش یافت [۲۵]. ضیایی و همکاران (۲۰۱۷) با بررسی اثر ضد میکروبی نانولیپوزوم های حاوی نایسین و ناتامایسین بر رشد استافیلوکوکوس اورئوس گزارش کردند که استفاده از نایسین و ناتامایسین درون پوشانی شده در مقایسه با شکل آزاد، تاثیر معنی داری بر کاهش تعداد باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس داشت [۲۶]. در همین ارتباط، فیروزآبادی و همکاران (۲۰۱۶) طی مطالعات خود نشان دادند استفاده از سوسپانسیون نانو ذرات اکسید- روی حاوی اسید سیتریک در محیط آب میوه انبه طی انبارداری در دمای اتاق، سبب کاهش ۵ سیکل لگاریتمی در تعداد باکتری های استافیلوکوکوس اورئوس گردید که با نتایج این پژوهش مطابق بود [۲۷].

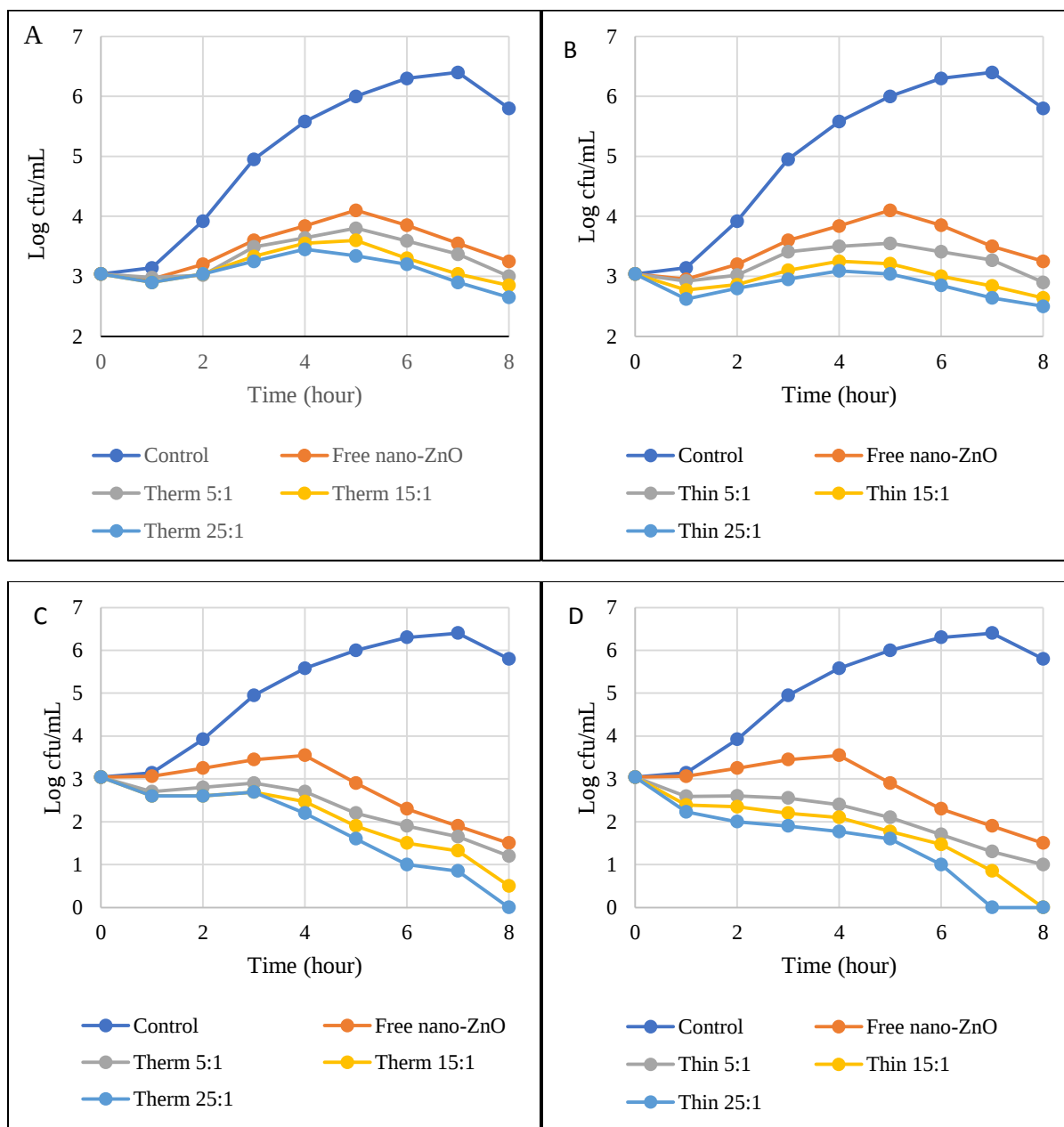


Fig. 2. Time-kill graph of free nano-ZnO and nano-ZnO loaded nanoliposomes prepared by thin layer hydration sonication (Thin) and heat method (Therm) with the different ratio of lecithin: nano-ZnO (5:1, 15:1 and 25:1 w/w) against *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) at MIC value of free nano-ZnO and nano-ZnO loaded nanoliposomes prepared by Therm (A) and Thin (B) and MBC value of free nano-ZnO and nano-ZnO loaded nanoliposomes prepared by Therm (C) and Thin (D). In all figures "Control" means growth without any antimicrobial agent.

۴- نتیجه گیری

پوشانی شده در نانولیپوزوم تولید شده به روش آب پوشانی لایه نازک در مقایسه با روش حرارتی قدرت ضد میکروبی بالاتری داشتند ($p < 0.05$). افزایش نسبت لستین به نانوذرات اکسید روی اثر معنی داری بر کاهش مقادیر حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) نانوذرات اکسید روی درون پوشانی شده در نانولیپوزوم داشت. به طور کلی افزایش قدرت ضد میکروبی نانوذرات درون پوشانی شده با نانولیپوزوم ها را می توان به افزایش میزان نفوذ به داخل سلول میکروارگانیسم و چسبندگی مطلوب تر نانولیپوزوم ها به سطح دیواره سلولی میکروارگانیسم ها مرتبط دانست.

۵- منابع

- [1] Huang, Q., Yu, H., & Ru, Q. (2010). Bioavailability and delivery of nutraceuticals using nanotechnology. *Journal of Food Science*, 75(1), R50-R57.
- [2] Nile, S. H., Baskar, V., Selvaraj, D. Nile, A., Xiao, J., & Kai, G. (2020). Nanotechnologies in food science: applications, recent trends, and future perspectives. *Nano-Micro Letters*, 12, 45.
- [3] Acosta, E. (2009). Bioavailability of nanoparticles in nutrient and nutraceutical delivery. *Current opinion in colloid and interface science*, 14(1), 3-15.
- [4] Sauvant, P., Cansell, M., Sassi, A. H., & Atgié, C. (2012). Vitamin A enrichment: Caution with encapsulation strategies used for food applications. *Food Research International*, 46(2), 469-479.
- [5] Keller, B. C. (2001). Liposomes in nutrition. *Trends in Food Science and Technology*, 12(1), 25-31.
- [6] Neshastegir, M. H., Mohebi, M., & Hadad Khodaparast, M. H. (2018). Preparation nanoliposome containing orange essential oil

استفاده از ترکیبات ضد میکروب در مقیاس نانومتری تحول عظیمی در صنایع مختلف به ویژه صنعت غذا ایجاد کرده است. در این میان، نانوذرات فلزی و به ویژه اکسیدهای فلزی از جمله نانوذرات اکسیدروی به دلیل قدرت ضد میکروبی مطلوب و از طرف دیگر تایید سازمان غذا و دارو برای مصارف غذایی، توجه بیشتری را در میان پژوهشگران صنعت غذا به خود جلب نموده است. نتایج این پژوهش نشان داد که با درون پوشانی نانوذرات اکسید روی درون نانولیپوزوم ها قدرت ضد میکروبی آن ها افزایش معنی داری یافت ($p < 0.05$). نوع روش به کار گرفته شده در تولید این نوع نانوذرات نیز در افزایش فعالیت ضد میکروبی آن ها به شکل معنی داری موثر بود. نانوذرات اکسید روی درون

using heat method. *Journal of Innovation in Food Science and Technology*, 10 (2), 115-122 [in Persian].

- [7] Mozafari, M. R., Flanagan, J., Matia-Merino, L., Awati, A., Omri, A., Suntutres, Z. E., & Singh, H. (2006). Recent trends in the lipid-based nanoencapsulation of antioxidants and their role in foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86(13), 2038-2045.
- [8] Mozafari, M. R. (2005). Liposomes: an overview of manufacturing techniques. *Cellular and molecular biology letters*, 10(4), 711-719.
- [9] Taylor, T. M., Weiss, J., Davidson, P. M., & Bruce, B. D. (2005). Liposomal nano capsules in food science and agriculture. *Critical reviews in Food science and Nutrition*, 45(7-8), 587-605.
- [10] Maherani, B., Arab-Tehrany, E., Mozafari, M.R., & Gaiani, C. and Linder, M. (2011). Liposomes: A Review of Manufacturing Techniques and Targeting Strategies. *Current Nanoscience*, 7(3), 436-452.
- [11] Blanco-Padilla, A., Soto, K. M., Iturriaga, M. H., & Mendoza, S. (2014). Food

- antimicrobials nanocarriers. *The Scientific World Journal*, 2014, Article ID 837215.
- [12] Mirhosseini, M. Kiany Harchegani, M., Kakai Dehkordi, S. Barzegary & Firouzabadi, F. (2013). Comparison of antibacterial effect of ZnO nanoparticles in apple juice at 25 and 4. *Quarterly Journal of Experimental Animal Biology*, 2 (3), 9-15 [in Persian].
- [13] Emamifar, A., & Mohamadizadeh, M. (2020). Influence of sonication and antimicrobial packaging-based nano-ZnO on the quality of fresh strawberry juice during cold storage. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14 (6), 3280-3290.
- [14] Dimapilis, E. A. S., Hsu, C. S., Mendoza, R. M. O., Lu, M. C. (2018). Zinc oxide nanoparticles for water disinfection. *Sustainable Environment Research*, 28 (2), 47-56.
- [15] Muthukrishnan, L. (2022). Nanonutraceuticals - challenges and novel nano-based carriers for effective delivery and enhanced bioavailability. *Food and Bioprocess Technology*, 15, 2155-2184.
- [16] Rasti, B., Jinap, S., Mozafari, M. R., & Yazid, A. M. (2012). Comparative study of the oxidative and physical stability of liposomal and nanoliposomal polyunsaturated fatty acids prepared with conventional and Mozafari methods. *Food Chemistry*, 135, 2761-2770.
- [17] Cao, D., Shu, X., Zhu, D., Liang, S., Hasan, M., & Gong, S. (2020). Lipid-coated ZnO nanoparticles synthesis, characterization and cytotoxicity studies in cancer cell. *Nano Convergence*, 7, 14.
- [18] Momeni-Javid, Z., Hamishekar, H., Rahmati-Yamchi, M., Zarghami, N., Akbarzadeh, A. & Milani, M. (2017) Evaluation and study of antimicrobial activity of nanoliposomal meropenem against *Pseudomonas aeruginosa* isolates. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*, 45 (5), 975-980.
- [19] Avila, J. G., de Liverant, J. G., Martinez, A., Martinez, G., Munoz, J. L., Arciniegas, A., & de Vivar, A. R. (1999). Mode of action of Buddleja cordata verbascoside against Staphylococcus aureus. *Journal of ethnopharmacology*, 66(1), 75-78.
- [20] Gortzi, O., Lala, S., Chinou, I., & Tsaknis, J. (2007). Evaluation of the antimicrobial and antioxidant activities of Origanum dictamnus extracts before and after encapsulation in liposomes. *Molecules*. 12(5), 932-945.
- [21] Tayle, A. A., El-tras, W. F., Moussa, Sh., El.bazi, A. F., Mahrous, H., Salem, M. F., and Brimer, L. (2011) Antibacterial action of zinc oxide nanoparticles against foodborne pathogens. *Journal of Food Safety*, 31(2), 211-218.
- [22] Li, H., Li, F., Wang, L., Sheng, J., Xin, Z., Zhao, L., Xiao, H., Zheng, Y. & Hu, Q. (2009). Effect of nano-packing on preservation quality of Chinese jujube (*Ziziphus jujuba* Mill. var. *inermis* (Bunge) Rehd). *Journal of Food Chemistry*, 114, 547-552.
- [23] Were, L. M., Bruce, B., Davidson, P. M., & Weiss, J. (2004). Encapsulation of nisin and lysozyme in liposomes enhances efficacy against *Listeria monocytogenes*. *Journal of food protection*, 67(5), 922-927.
- [24] Jin, T., Sun, D., Su, J. Y., Zhang, H., & Sue, H. J. (2009). Antimicrobial efficacy of zinc oxide quantum dots against *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*, & *Escherichia coli* O157: H7. *Journal of food science*, 74(1), 46-52.
- [25] Aleaghil, S. A., Fattahy, E., Baei, B., Saghali, M., Bagheri, H., Javid, N., & Ghaemi, E. A. (2016) Antibacterial activity of zinc oxide nanoparticles on *Staphylococcus aureus*. *International Journal of Advanced Biotechnology and Research*, 7(3), 1569-1575.
- [26] Ziaee, M., Sowti Khiabani, M., Tizchang, S., Ghanbarzadeh, B., Hamishekar, H., & Rezay Mokaram, R. (2017). Study of antibacterial effect of nano-encapsulated nisin and natamycin in liposomes against the growth

of *Staphylococcus aureus* and *Aspergillus niger*. *Journal of food science and technology (Iran)*, 62 (14), 142-259 [in Persian].

[27] Firouzabadi, F. B., Marzban, Z., Khaleghizadeh, S., Daneshmand, F., &

Mirhosseini, M. (2016). Combined effects of zinc oxide nanoparticle and malic acid to inhibit *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*".

Iran Journal of Medical Microbiology, 10(5), 52-9 259 [in Persian].



Scientific Research

Time-kill kinetic of nano ZnO-loaded nanoliposomes against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*

Parvin Souri¹, Aryou Emamifar^{2*}, Nafiseh Davati³

- 1- Graduated Student of Food Sciences and technology, Department of Food Science and Technology, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran.
- 2- Associated professor, Department of Food Science and Technology, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran.
- 3- Assistant professor, Department of Food Science and Technology, Bu-Ali Sina University, Hamedan, Iran.

ABSTRACT

The objective of this study was to in-vitro investigation of antimicrobial activity effect of nano-ZnO loaded nanoliposomes at different level of lecithin: nano-ZnO ratio (5:1, 15:1, and 25:1 w/w) against *Escherichia coli* (ATCC 2592) and *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Nano-ZnO loaded nanoliposomes were prepared through thin layer hydration sonication and heat methods. The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC) of nano-ZnO loaded nanoliposomes and free nano-ZnO against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* were determined and their antimicrobial activities were evaluated by time-kill curve analysis. Results showed that the encapsulation of nano-ZnO in nanoliposome systems significantly increased antimicrobial activities of them by increasing their penetration into the microbial cell. Nano-ZnO loaded nanoliposomes were prepared through thin layer hydration showed higher antimicrobial activity compared to those prepared by heat method. From the time-kill curves, the log phase growth of *Escherichia coli* (8 hours) and *Staphylococcus aureus* (7 hours) in the medium containing nano-ZnO loaded nanoliposomes prepared through the thin layer hydration sonication at the highest level of lecithin: nano-ZnO ratio (25:1 w/w) at MIC and MBC values decreased to 5 and 4 hours and to 2 and less than 1 hours, respectively.

ARTICLE INFO

Article History:

Received: 2023/7/4

Accepted: 2023/8/12

Keywords:

Time-kill kinetic,

Nanoliposome,

Nano-ZnO.

DOI: 10.22034/FSC.T.20.141.36
DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.141.3.1

*Corresponding Author E-Mail:
a.emamifar@basu.ac.ir